

## SECCIÓN 3.8.

# OVIDAE Y CAPRIDAE

---

### CAPÍTULO 3.8.1.

## ENFERMEDAD DE LA FRONTERA

### RESUMEN

*La enfermedad de la frontera (EF) es una enfermedad vírica de las ovejas y las cabras descrita por primera vez en 1959 en ovejas de la región fronteriza entre Inglaterra y Gales, y diagnosticada desde entonces en todo el mundo. Las tasas de prevalencia varían en las ovejas del 5 al 50% entre países y de una región a otra dentro en cada uno de ellos. Entre los signos, destacan la esterilidad de las ovejas, la aparición de abortos y nacidos muertos y el nacimiento de corderos débiles de tamaño inferior al normal. Los corderos afectados pueden mostrar temblores musculares, un desarrollo corporal deficiente y vellones anormalmente peludos (a los corderos se les llama “temblosos peludos” o “de lana rizada”) y a la enfermedad se le ha denominado “enfermedad de los corderos temblosos peludos”. La transmisión vertical juega un papel importante en la epidemiología de la enfermedad. La infección de los fetos puede provocar el nacimiento de corderos con infección persistente (IP). Estos corderos IP son virémicos, con anticuerpos negativos y excretan el virus de manera constante. El virus se propaga de oveja a oveja, y los animales IP son la fuente más potente de infección. La infección es menos común en las cabras y el principal síntoma en ellas es el aborto.*

*La EF está causada por un Pestivirus denominado virus de la enfermedad de la frontera (VEF), pero en ciertas partes del mundo, sobre todo donde existe un contacto directo entre ovejas o cabras y ganado bovino, la infección por el virus de la diarrea viral bovina (VDVB) puede causar los mismos signos clínicos. Por lo tanto, al investigar brotes de enfermedad o certificar animales o germoplasma para el comercio internacional es necesario tener en cuenta las diferencias genéticas y antigénicas existentes entre el VEF y el VDVB. Es importante identificar los animales IP virémicos para que no sean utilizados con fines comerciales o de cría. Las pruebas serológicas resultan insuficientes. Generalmente se considera que las ovejas no virémicas, seropositivas son “seguras”, ya que no se conoce que se produzcan infecciones latentes en los animales recuperados.*

**Identificación del agente:** *El virus de la EF (VEF) es un Pestivirus de la familia Flaviviridae y está estrechamente relacionado con el virus de la peste porcina clásica y el VDVB. Muy pocas cepas del VEF son citopatógenas en cultivo celular. No existen serotipos definidos, pero las cepas víricas presentan una considerable diversidad antigénica. Se han identificado varios genotipos independientes.*

*Pueden identificarse ovejas con IP aparentemente sanas mediante la detección directa del virus o del ácido nucleico en sangre o tejidos, o bien mediante el aislamiento del virus en cultivo celular seguido de inmunotinción para detectar el virus no citopatógeno.*

**Métodos de diagnóstico:** *La demostración de la presencia del virus mediante cultivo y detección de antígeno puede resultar menos fiable en corderos menores de dos meses que han recibido anticuerpos calostrales. Habitualmente, la infección aguda es subclínica y la viremia es transitoria y difícil de detectar. A menudo es difícil aislar el virus a partir de tejidos de corderos abortados o nacidos muertos, pero se puede detectar el virus mediante métodos sensibles de reacción en*

cadena de la polimerasa que permitan detectar ácido nucleico residual. No obstante, los tejidos y la sangre de ovejas que lleven algo más que unos pocos meses con IP contienen niveles elevados del virus, que se pueden identificar fácilmente mediante el aislamiento y métodos directos de detección de antígenos o ácidos nucleicos. Dado que las ovejas pueden resultar infectadas por el VDVB, es preferible utilizar pruebas de diagnóstico que sean reactivas frente a todos los pestivirus y que detecten con facilidad todas las cepas del VF y del VDVB.

**Pruebas serológicas:** Es preferible confirmar la infección aguda por el DVB demostrando la seroconversión con muestras pareadas o secuenciales procedentes de varios animales del grupo. Los métodos de detección de anticuerpos que se utilizan más habitualmente son el enzoinmunoanálisis y la prueba de neutralización vírica. Debido a las diferencias antigénicas existentes entre el VEF y el VDVB, las pruebas para la detección de anticuerpos contra el VEF, sobre todo la VN, preferiblemente deben basarse en una cepa de VEF.

**Requisitos para las vacunas:** No existe una vacuna estándar para el VEF, pero se ha preparado una vacuna comercial con el virus entero muerto. Lo ideal sería que dicha vacuna fuese adecuada para su administración a hembras antes de la crianza para prevenir la infección transplacentaria. Se ha recomendado el uso de las vacunas contra el VDVB, pero se debe tener en cuenta la diversidad antigénica de los virus de la EF.

Los virus de la EF han contaminado diversas vacunas vivas modificadas de uso veterinario producidas en células de oveja o que contienen suero de oveja. Los fabricantes de los materiales biológicos deben considerar este riesgo potencial.

## A. INTRODUCCIÓN

El virus de la enfermedad de la frontera (VEF) es un *Pestivirus* de la familia *Flaviviridae* y está estrechamente relacionado con el virus de la peste porcina clásica (VPPC) y el virus de la diarrea viral bovina (VDVB). Existen cuatro especies reconocidas oficialmente, a saber: VPPC, VDVB tipo 1 y 2 y VEF (ICTV, 2016), pero se han reportado otros pestivirus que se consideran especies claramente diferenciadas. Mientras que los VPPC se restringen principalmente a los cerdos, se han recuperado a partir de ovejas ejemplos de las otras tres especies. Asimismo, aunque la mayoría de cepas se han identificado como virus de la EF en zonas donde se criaban ovejas o cabras aisladas de otras especies (Vilcek *et al.*, 1997), en zonas en las que existe un contacto directo entre pequeños rumiantes y ganado bovino se ha identificado el VDVB con frecuencia (Carlsson, 1991). Y aunque casi todas las cepas víricas del VEF son no citopatógenas, se han aislado virus citopáticos ocasionales (Vantsis *et al.*, 1976). El VEF se propaga de forma natural entre las ovejas por vía oro-nasal y por transmisión vertical. Es causa de enfermedad congénita principalmente en ovejas y cabras, pero también puede provocar infecciones agudas y persistentes. La infección es menos frecuente en las cabras, en las que es raro encontrar infección persistente dado que el aborto es el principal signo presente. Asimismo, los cerdos pueden resultar infectados por pestivirus distintos CSDV y los anticuerpos frente al VEF en cerdos pueden interferir en las pruebas de diagnóstico de la enfermedad debida al VPPC (Oguzoglu *et al.*, 2001). Se han descrito algunos genotipos del virus de la EF de las ovejas, cabras y el rebeco del Pirineo (*Rupicapra pyrenaica pyrenaica*). El análisis filogenético mediante la utilización del análisis por ordenador de secuencias de nucleótidos sugiere que la variabilidad de los virus de la EF es mayor que la existente dentro de cada una de las restantes especies de *Pestivirus*. Se han descrito cuatro genogrupos de VEF y genotipos de *Pestivirus* supuestamente novedosos en ovejas y una cabra de Túnez (Becher *et al.*, 2003; Vilcek & Nettleton, 2006). El virus de la EF del rebeco es semejante al de las cepas ovinas de la Península Ibérica (Valdazo-Gonzalez *et al.*, 2007). Este capítulo describe la infección por el VEF en ovejas. En el Capítulo 3.4.7 *Diarrea viral bovina* se ofrece información sobre métodos de diagnóstico relacionados.

### 1. Infecciones agudas

Las ovejas adultas y recién nacidas sanas expuestas al VEF suelen experimentar tan solo una enfermedad leve o inapreciable. Aparece una fiebre ligera y una leucopenia leve que se asocian con una viremia corta que se detecta entre los días 4 y 11 posteriores a la infección, después de la cual aparecen anticuerpos neutralizantes del virus en el suero (Thabti *et al.*, 2002).

En las pruebas serológicas se diagnostican mejor las infecciones agudas empleando sueros pareados procedentes de un número significativo de ovejas. Se ha demostrado que algunas cepas ocasionales del VEF provocan fiebre elevada, leucopenia profunda y prolongada, anorexia, conjuntivitis, descarga nasal, disnea y diarrea y el 50% de la mortalidad en los corderos jóvenes. Una de estas cepas se recuperó a partir de una epidemia severa de la EF que afectó a ovejas lecheras en 1984 (Chappuis *et al.*, 1986). Una segunda cepa de ese tipo fue un VEF contaminante de una vacuna viva del VPPC (Wensvoort & Terpstra, 1988).

## 2. Infección fetal

Los principales signos clínicos de la EF se observan después de la infección de ovejas gestantes. Mientras que la infección materna inicial es leve y subclínica, las consecuencias en el feto son graves. Puede provocar la muerte del feto en cualquier etapa de gestación, pero aquella es más común en los fetos infectados a una edad temprana. Es posible que se produzca la reabsorción de los fetos pequeños muertos o que pueda pasar desapercibido su aborto, ya que las ovejas continúan alimentándose de forma correcta y no muestran signos de malestar. Cuando se aproxima el momento de los partos, se observará el aborto de fetos mayores, nacidos muertos y el nacimiento prematuro de corderos pequeños y débiles. Frecuentemente, es difícil establecer la confirmación de que un aborto o un nacido muerto se deben al VEF, pero en algunos casos es posible aislar el virus a partir de tejidos fetales. El uso de una reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR) puede ofrecer un nivel de éxito más alto debido a las ventajas de la alta sensibilidad y de la capacidad de detectar genoma de virus no infeccioso. En los fetos abortados, también se puede detectar el virus mediante inmunohistoquímica del cerebro, tiroides y otros tejidos (Thur *et al.*, 1997). Se debe comprobar la presencia de anticuerpos dirigidos contra el VEF en muestras de fluidos fetales o de suero.

Durante la época de los partos, aparecerá una cantidad excesiva de ovejas estériles, pero son los corderos vivos enfermos los que presentan los principales rasgos clínicos característicos de la EF. Son muy variados los signos clínicos que exhiben los corderos con la EF y dependen de la raza de oveja, la virulencia del virus y el momento en el que se produce la infección en el rebaño. Habitualmente, los corderos afectados son pequeños y débiles, y muchos son incapaces de permanecer incorporados. Con frecuencia aparecen signos nerviosos y cambios de vellón. Los signos nerviosos de la EF son los más característicos. Los temblores pueden variar desde contracciones rítmicas violentas de los músculos de las patas traseras y de la espalda, a un ligero temblor apenas detectable de la cabeza, orejas y rabo. Las anomalías del vellón son más obvias en las razas de lana fina, que desarrollan vellones peludos, especialmente en el cuello y la espalda. En los corderos afectados por la EF también se puede observar una pigmentación anormal negra o marrón del vellón. Se debe analizar la presencia del VEF y/o de anticuerpos dirigidos contra él en muestras de sangre que se deben recoger con anticoagulante procedentes de corderos sospechosos antes de que reciban el calostro. Una vez que lo han ingerido, es difícil aislar el virus hasta que tienen 2 meses y han descendido los niveles de anticuerpos maternos. Sin embargo, durante este periodo, es posible detectar el antígeno vírico en biopsias cutáneas, mediante inmunohistoquímica en los leucocitos lavados, mediante enzimoanálisis (ELISA) o mediante reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) o mediante RT-PCR en tiempo real. Los ELISA dirigidos a la detección del antígeno Erns parecen ser menos propensos a sufrir la interferencia de los anticuerpos maternos y a menudo pueden emplearse para detectar antígeno en el suero.

Mediante atención adecuada, es posible criar algunos corderos con la EF, aunque pueden ocurrir muertes en cualquier momento. Los síntomas nerviosos se reducen de forma gradual y pueden desaparecer a los 3–6 meses de vida. En los momentos de estrés puede reaparecer un andar tambaleante con debilidad y oscilación de los cuartos traseros junto con un ligero temblor de la cabeza. Frecuentemente, los corderos afectados crecen con lentitud y, en condiciones normales de campo, muchos morirán antes del destete o durante el mismo. En los casos en los que durante la época de los partos ha habido pocas pérdidas y no han nacido corderos con síntomas evidentes de la EF, este puede ser el primer síntoma de la enfermedad.

Algunas infecciones fetales que se producen en la etapa media de la gestación pueden provocar signos nerviosos graves en los corderos, problemas locomotores y esqueletos anormales. Estos corderos presentan lesiones de hipoplasia cerebelar y displasia, hidroncefalia y proencefalia como resultado de una inflamación necrótica. Las lesiones destructivas graves parecen estar mediadas por anticuerpos, y con frecuencia los corderos con tales lesiones presentan títulos elevados de anticuerpos en el suero contra el VEF. La mayoría de los corderos infectados en la etapa final de gestación son normales, están sanos y nacen libres del virus, pero presentan anticuerpos frente al VEF. Algunos de estos corderos pueden estar débiles y es posible que mueran tempranamente (Barlow & Patterson, 1982).

## 3. Viremia persistente

Cuando los fetos sufren una infección que se produce antes del inicio de la inmunocompetencia, nacen con una viremia persistente. El feto ovino puede responder por primera vez a un estímulo antigénico aproximadamente entre los días 60 y 85 de su periodo de gestación de 150 días. En los fetos afectados antes del inicio de la inmunocompetencia, se produce una replicación vírica incontrolada y es común la muerte del 50% de los fetos. En los corderos que sobreviven a la infección producida en la etapa temprana de gestación, el virus se propaga a todos los órganos. Estos corderos parecen ser tolerantes al virus y presentan una infección persistente, normalmente de por vida. Una muestra de sangre precalostrada será positiva al virus y negativa a los anticuerpos. Típicamente, no existe reacción inflamatoria y los cambios patológicos más característicos se aprecian en el sistema nervioso central (SNC) y en la piel. Existe una deficiencia de mielina en todo el SNC, lo que provoca los signos nerviosos. En la piel, los folículos primarios de lana aumentan de tamaño y decrece el número de folículos secundarios de lana, lo que causa el vellón peludo o hirsuto.

Las ovejas con viremia persistente se pueden identificar mediante la detección de antígenos o ácido nucleico del virus o bien de virus infeccioso en una muestra de sangre. La viremia es fácilmente detectable con un análisis del suero en cualquier momento, excepto durante los primeros 2 meses de vida, cuando el virus está enmascarado por los anticuerpos calostrales, y, posiblemente, en animales mayores de 4 años, algunos de los cuales desarrollan niveles escasos de anticuerpos frente al VEF (Nettleton *et al.*, 1992). Es posible que resulten preferibles métodos distintos del aislamiento del virus para evitar la interferencia por anticuerpos. Cuando se sospeche de la presencia de anticuerpos calostrales, se puede detectar el virus en leucocitos lavados y en piel utilizando ELISA sensibles. Aunque resulta difícil la detección del virus en la sangre durante una infección aguda, se debe confirmar la viremia persistente volviendo a realizar pruebas a los animales después de un intervalo de al menos 3 semanas. La RT-PCR en tiempo real debe considerarse siempre y con cualquier tipo de muestra debido a su alta sensibilidad analítica y al hecho de que no resulta afectada por los anticuerpos que pueda contener la muestra.

Algunas ovejas virémicas sobreviven a la madurez sexual y se utilizan para la crianza. Los corderos nacidos de estas hembras progenitoras infectadas son siempre virémicos persistentes. Las ovejas virémicas persistentes constituyen una fuente continua de virus infecciosos para otros animales y su identificación es un factor primordial en cualquier programa de control. Se deben examinar las ovejas que van a ser comercializadas para garantizar la ausencia de viremia del VEF.

Habitualmente, los carneros infectados de forma persistente (IP) tienen un semen de baja calidad muy infectante y presentan una fertilidad reducida. Todos los carneros utilizados para la cría deben ser examinados para descartar una infección persistente del VEF en muestras de sangre. También se pueden examinar las muestras de semen, pero el aislamiento vírico es mucho menos satisfactorio que el obtenido a partir de la sangre debido a la toxicidad del semen para los cultivos celulares. La utilización de la RT-PCR para detectar el ácido nucleico del pestivirus normalmente permitirá resolver los problemas de toxicidad, y por lo tanto esta prueba es útil para analizar el semen de los carneros.

#### 4. Inicio tardío de la enfermedad en ovejas con viremia persistente

Algunas ovejas IP alojadas separadamente de otros animales desarrollan de forma espontánea una diarrea intratable, desechos, descargas nasales y oculares abundantes, debilitantes e incurables, a veces con dificultad respiratoria. En la necropsia estas ovejas se observa un serio engrosamiento del íleo distal, ciego y colon como resultado de una enteropatía hiperplásica focal. El VEF citopático se puede recuperar a partir del intestino de estos corderos. Al no existir una fuente externa obvia del virus citopático, lo más probable es que tales virus se originen a partir de los virus propios del cordero, algo similar a lo que ocurre con el VDV. Otras ovejas IP del grupo no desarrollan la enfermedad. Este síndrome, que se ha producido experimentalmente y se ha reconocido en brotes de campo ocasionales de la EF, presenta varias similitudes con la enfermedad mucosa bovina (Nettleton *et al.*, 1992).

## B. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

**Tabla 1.** Métodos analíticos disponibles para el diagnóstico de la enfermedad de la frontera y su propósito

Método	Propósito					
	Demostrar ausencia de infección en la población	Demostrar ausencia de infección en animales individuales antes de los desplazamientos	Contribuir a las políticas de erradicación	Confirmar casos clínicos	Determinar la prevalencia de la infección – vigilancia	Determinar el estado inmunitario en animales o poblaciones tras la vacunación
<b>Identificación del agente<sup>1</sup></b>						
<b>Aislamiento del virus</b>	+	++	++	+++	–	–
<b>Detección de antígeno por ELISA</b>	+	++	+++	+++	–	–

1 Se recomienda aplicar una combinación de varios métodos de identificación del agente a una misma muestra clínica.

Método	Propósito					
	Demostrar ausencia de infección en la población	Demostrar ausencia de infección en animales individuales antes de los desplazamientos	Contribuir a las políticas de erradicación	Confirmar casos clínicos	Determinar la prevalencia de la infección – vigilancia	Determinar el estado inmunitario en animales o poblaciones tras la vacunación
Detección de AN por RT-PCR en tiempo real	+++	+++	+++	+++	+++	–
Detección de AN por ISH	–	–	–	+	–	–
<b>Detección de respuesta inmunitaria</b>						
ELISA	++	++	++	+	++	++
VN	+++	+++	++	+++	+++	+++

Clave: +++ = método recomendado para este propósito; ++ = método recomendado pero tiene limitaciones; + = método adecuado en muy pocas situaciones; – = no adecuado para este propósito.

ELISA = enzimoimmunoanálisis; IHC = inmunohistoquímica; AN = ácido nucleico; RT-PCR = reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa; ISH = hibridación *in-situ*; VN = prueba de neutralización vírica

## 1. Identificación del agente

No existe un laboratorio de referencia de la OIE designado para el VEF, pero los laboratorios de referencia para el VDVB o para el VPPC podrán aconsejar de forma adecuada (véase el cuadro de la parte 3 del presente *Manual de animales terrestres*). Uno de los métodos que se ha comprobado que es más sensible para identificar el VEF sigue siendo el aislamiento vírico. Sin embargo, para analizar muestras que sean difíciles de manejar en la prueba del aislamiento del virus, pueden emplearse RT-PCR en tiempo real que reaccionen frente a gran variedad de virus (preferiblemente las que reaccionen frente a todos los pestivirus), que normalmente proporcionan una sensibilidad analítica más alta que el aislamiento del virus y que pueden ejecutarse en unas pocas horas. El ELISA para la detección de antígeno y la inmunohistoquímica en cortes de tejido también son métodos útiles para identificar animales infectados por el VEF.

### 1.1. Aislamiento vírico

Es esencial que los laboratorios que realicen el aislamiento del virus tengan un suministro garantizado de células susceptibles y suero bovino fetal (FBS), o equivalente, libres de pestivirus, que no contengan actividad antipestivirus ni contaminación vírica. Es importante que se siga un programa que garantice la calidad del laboratorio. En el Capítulo 3.4.7 se proporcionan métodos detallados para el aislamiento de pestivirus tanto en tubo como en microplaca de cultivo a partir de muestras de oveja o de cabra, como suero, sangre completa, semen o tejidos. Los principios y las precauciones descritos en aquel capítulo para la elección de los cultivos celulares, los componentes del medio y los reactivos son igualmente aplicables a este capítulo. Siempre que para la detección de antígeno o de ácido nucleico se utilicen reactivos que se sepa que funcionan frente a todos los pestivirus (como anticuerpos monoclonales [MAb], cebadores y sondas para la RT-PCR en tiempo real), la diferencia principal radicará en la selección de los cultivos celulares.

Se puede aislar el VEF en distintos cultivos celulares primarios o secundarios (p.ej. riñón, testículo, pulmón). Son raras las líneas celulares ovinas para la replicación del VEF. Pueden ser útiles las líneas celulares semicontinuas derivadas de músculo de cordero fetal (FLM), embriones completos (Thabti *et al.*, 2002) o plexo coroideo de oveja, pero las diferentes líneas varían de manera considerable en su susceptibilidad frente al virus. Se han utilizado con éxito células ovinas para el aislamiento y replicación de los virus de la EF y del VDVB de los tipos 1 y 2 a partir de ovejas. En las regiones en las que las ovejas pueden infectarse con los VDVB a partir de vacas, lo más adecuado sería utilizar un sistema de aislamiento vírico con células tanto ovinas como bovinas. No obstante, las células bovinas ofrecen menos sensibilidad para el aislamiento primario y la multiplicación de algunos virus de la EF, por lo que se desaconseja la dependencia exclusiva de células bovinas. En el Capítulo 3.4.7 se ofrece información sobre los cultivos celulares bovinos más adecuados. Las precauciones indicadas en aquel

capítulo en cuanto al establecimiento de células y componentes del medio que estén libres de contaminación por pestivirus o anticuerpos, así como las medidas para garantizar que las células sean susceptibles a gran variedad de cepas naturales locales también son aplicables a los sistemas de detección del VEF.

Cuando se cuenta con animales vivos, el suero es la muestra más utilizada para comprobar la presencia de virus infeccioso. No obstante, en los casos difíciles, la forma más sensible de confirmar una viremia por pestivirus consiste en lavar leucocitos repetidamente (al menos tres veces) con el medio de cultivo antes de cocultivarlos con las células susceptibles ya sea en tubos o en microplacas de cultivo celular. Tras un cultivo de 5–7 días, los cultivos deben congelarse y descongelarse una vez y debe pasarse una alícuota de líquido del cultivo diluido por más células susceptibles cultivadas en microplacas o en portaobjetos con cámara para poder detectar el antígeno mediante la técnica de la inmunohistoquímica. Con una tinción para pestivirus no citopáticos normalmente se detectará el virus al final del pase primario, pero para detectar virus de crecimiento lento en células poco permisivas, será deseable realizar dos pases. Se recomienda que el sobrenadante del cultivo utilizado como inóculo para el segundo pase se diluya a aproximadamente 1/100 en medio de cultivo nuevo porque ciertas cepas naturales de título alto se replicarán mal si el pase se realiza sin dilución (es decir, a una alta multiplicidad de infección [moi]).

Se deben recoger los tejidos a partir de los animales muertos en un medio de transporte vírico. En el laboratorio, los tejidos se trituran para obtener una suspensión al 10-20% (p/v), se centrifugan para eliminar los residuos y el sobrenadante se pasa a través de filtros de 0,45 µm. Las lesiones de bazo, pulmón, tiroides, timo, riñón, cerebro, ganglios linfáticos e intestino son las mejores para el aislamiento vírico.

Se puede examinar el semen para determinar la presencia del VEF, pero el semen sin tratar es fuertemente citotóxico y se debe diluir; normalmente se diluye a 1/10, como mínimo, en medio de cultivo. Como la principal fuente de semen infectado por el VEF procede de carneros IP, para identificar estos animales es más fiable la sangre que el semen como muestra clínica. Existen muchas variaciones en los procedimientos de aislamiento vírico. Se deben optimizar todos ellos para alcanzar la máxima sensibilidad utilizando una preparación vírica estándar de referencia y, cuando sea posible, cepas recientes naturales del VEF. La mayoría de limitaciones del aislamiento del virus para la detección del VEF en suero o sangre, tejidos o semen se pueden superar utilizando una RT-PCR en tiempo real que reaccione frente a todos los pestivirus y sea sensible. Algunos laboratorios realizan un cribado de las muestras con una RT-PCR en tiempo real y llevan a cabo el aislamiento del virus con muestras positivas para obtener cepas del VEF que sirvan de referencia en futuros estudios de investigación.

En el capítulo 3.4.7 se proporcionan datos técnicos específicos de los procedimientos de aislamiento del virus, como la técnica de la tinción con inmunoperoxidasa.

## 1.2. Métodos de detección del ácido nucleico

Se han determinado las secuencias genómicas completas de tres virus de la EF y se han comparado con las de otros pestivirus (Becher *et al.*, 1998; Ridpath & Bolin, 1997). El análisis filogenético muestra que los virus de la EF están más estrechamente relacionados con el VPPC que con el VDVB (Becher *et al.*, 2003; Van Rijn *et al.*, 1997; Vilcek & Nettleton, 2006; Vilcek *et al.*, 1997). Actualmente se utiliza mucho la RT-PCR en tiempo real para el diagnóstico de infecciones por pestivirus, y se han descrito varios formatos de la misma. Las pruebas de RT-PCR en tiempo real tienen las ventajas de permitir detectar tanto virus infeccioso como ácido nucleico residual, y esto último tiene utilidad en la investigación de los abortos y de las muertes de corderos. Además, la presencia de anticuerpos específicos de virus en una muestra no tendrá efectos adversos en la sensibilidad de la RT-PCR en tiempo real. Estas pruebas también son útiles para el cribado de semen, y cuando se siguen los protocolos de extracción de ácido nucleico recomendados, la técnica resulta menos afectada por los componentes del semen que al aplicar el aislamiento del virus. Dado que los pequeños rumiantes pueden resultar infectados por cepas del VEF genéticamente distintas o por cepas del VDVB, deberá emplearse una RT-PCR en tiempo real que se sepa que reacciona ante todos los pestivirus. En el Capítulo 3.4.7 se proporcionan protocolos adecuados tanto para la extracción de ácido nucleico como de RT-PCR en tiempo real. Deben aplicarse estrictamente todas las precauciones destinadas a minimizar la contaminación por parte del laboratorio.

Tras analizar las muestras con una prueba que reaccione ante todos los pestivirus, las muestras que den positivo se pueden volver a analizar aplicando una RT-PCR en tiempo real específica del VEF (Willoughby *et al.*, 2006). No obstante, es importante recordar que en ciertas poblaciones pueden estar circulando varios genotipos distintos del VEF, sobre todo en rumiantes salvajes como las gamuzas o los ciervos, los cuales pueden transmitirse a las ovejas. Deberá emplearse una prueba que sea

específica para la detección del VEF, pero con cierta precaución porque tal vez no detecte variantes o genotipos previamente no reconocidos, de ahí el valor de cribar inicialmente las muestras con una RT-PCR en tiempo real que reaccione ante todos los pestivirus.

### 1.3. Enzimoimmunoanálisis para la detección de antígeno

Se ha comprobado que los ELISA para la detección directa de antígeno de pestivirus en sangre o tejidos de animales infectados son extremadamente útiles para la detección de animales con IP y para el diagnóstico de la enfermedad. El primer ELISA para la detección antigénica de pestivirus se describió con el fin de detectar ovejas virémicas y más adelante se modificó convirtiéndolo en un ELISA de captura con sistema doble para utilizarlo en ovejas y ganado bovino (Entrican et al., 1994). Esta prueba es la más utilizada para identificar ovejas virémicas IP utilizando leucocitos sanguíneos lisados con detergente y lavados. La sensibilidad es parecida a la obtenida mediante el aislamiento vírico y es un método práctico para el cribado respecto al virus de grandes cantidades de muestras de sangre. Como en el aislamiento vírico, los niveles elevados de anticuerpos calostrales pueden enmascarar una viremia persistente. El ELISA es más efectivo que el aislamiento vírico en presencia de anticuerpos, pero puede dar resultados negativos falsos en corderos virémicos menores de 2 meses de edad. Habitualmente el ELISA no es lo bastante sensible para detectar infecciones agudas del VEF en muestras de sangre. Al igual que para la prueba con leucocitos, también se puede emplear el ELISA para detectar el antígeno en suspensiones de tejidos, especialmente de bazo, procedentes de ovejas sospechosas de IP, como una alternativa a los métodos de inmunofluorescencia y de inmunoperoxidasa en cultivos celulares. Se han publicado varios métodos de ELISA para pestivirus pero actualmente no existe ningún kit comercial que esté totalmente validado para la detección del VEF. Antes de utilizarlos con fines reguladores, estos kits deben estar validados en la zona en la que vayan a utilizarse para garantizar que permiten detectar una gran variedad de cepas naturales del VEF y que sean adecuados para los tipos de muestras con los que se trabaje.

### 1.4. Inmunohistoquímica

Es posible la detección de la presencia del antígeno vírico en la mayoría de los tejidos de los animales IP (Braun et al., 2002; Thur et al., 1997) aunque este método no se utiliza de forma habitual para el diagnóstico. Dicha detección se debe llevar a cabo con cortes de tejido congelados y fijados con acetona (cortes criostáticos) o con muestras incluidas en parafina empleando los anticuerpos apropiados. Se dispone de anticuerpos con especificidad por NS2-3 que reaccionan frente a todos los pestivirus. Los tejidos con grandes cantidades de antígeno vírico son el encéfalo, la tiroides, los pulmones y la mucosa oral. Se ha demostrado que las biopsias cutáneas son útiles para el diagnóstico *in vivo* de la infección persistente por el VEF.

## 2. Pruebas serológicas

Normalmente, los anticuerpos contra el VEF se detectan en los sueros de oveja utilizando la VN o el ELISA. No se recomienda emplear la prueba de inmunodifusión en gel de agar, que es menos sensible. En cada prueba se deben incluir sueros de referencia para control positivo y negativo. Para ser considerados válidos, estos deben dar resultados dentro de los límites predeterminados para la prueba. Se pueden probar sueros individuales para determinar la prevalencia del VEF en un rebaño, región o país. Sin embargo, para el diagnóstico, los sueros de la etapa aguda y convaleciente constituyen las muestras más adecuadas para confirmar una infección aguda por el VEF. Siempre se deben probar las muestras repetidas de suero procedente de cada animal, una junto a la otra en la misma placa para proporcionar una comparación fiable de los títulos.

### 2.1. Prueba de neutralización del virus

Debido a la diversidad antigénica existente entre los pestivirus, la elección del virus es difícil (Dekker et al., 1995; Nettleton et al., 1998). No existe la cepa de VEF ideal. Deberá utilizarse una cepa local que dé el máximo título de anticuerpos dentro de una gama de sueros ovinos positivos.

Dado que se dispone de pocas cepas citopatógenas del VEF, es más habitual utilizar una cepa local no citopatógena representativa y leer el resultado de la prueba tras una tinción de las células con inmunoperoxidasa. Servirán células ovinas libres de pestivirus y que se haya comprobado que son sensibles, como células testiculares o renales de cordero, que pueden conservarse como reservas congeladas de forma criogénica para utilizar durante largos periodos de tiempo. Las precauciones descritas para la selección de componentes del medio sin pestivirus también son aplicables a los reactivos que se utilicen en las pruebas de VN. A continuación se indica un procedimiento recomendado.

### 2.1.1. Procedimiento analítico

- i) Los sueros problema se inactivan por calor sometiéndolos 30 minutos a 56 °C.
- ii) A partir de una dilución inicial de 1/4, se llevan a cabo diluciones seriadas a la mitad de los sueros problema en una placa de microtitulación de 96 pocillos de fondo plano y grado cultivo celular, empleando el medio de cultivo celular como diluyente. Para cada muestra, se utilizan tres o cuatro pocillos a cada dilución en función del grado de precisión exigido. Asimismo, para cada muestra y a cada dilución del suero, se deja un pocillo sin virus para comprobar si aparecen indicios de toxicidad de la muestra que pudieran confundirse con la citopatología vírica o interferir con la replicación del virus. En cada lote de pruebas también deben incluirse sueros control positivo y negativo.
- iii) Se añaden a todos los pocillos volúmenes iguales (por ejemplo, de 50 µl) de una reserva de VEF que contenga 100 DICT<sub>50</sub> (dosis infectiva en el 50% de los cultivos tisulares expuestos). También se lleva a cabo una titulación por retroceso de la reserva de virus en algunos pocillos para comprobar la potencia del virus (intervalo de aceptación: 30–300 DICT<sub>50</sub>).
- iv) La placa se incuba 1 hora a 37°C.
- v) Se tripsiniza un frasco de células adecuadas (por ejemplo, células ovinas testiculares o renales) y se ajusta la concentración celular a  $2 \times 10^5$ /ml. Se añaden 100 µl de la suspensión celular a cada pocillo de la placa de microtitulación.
- vi) La placa se incuba a 37 °C durante 4-5 días, ya sea en una atmósfera con un 5% de CO<sub>2</sub> o con placa sellada.
- vii) Los pocillos se examinan al microscopio para asegurarse de que no hay signos de toxicidad ni de efecto citopático (ECP), y después se fijan y tiñen mediante la técnica de tinción con inmunoperoxidasa empleando un MAb adecuado. El título de VN para cada suero es la dilución a la cual el virus queda neutralizado en el 50% de los pocillos. Esto se puede calcular mediante los métodos de Spearman–Kärber o de Reed Muench. Los animales seronegativos no presentarán neutralización a la dilución más baja (es decir, 1/4), equivalente a una dilución final de 1/8. Para lograr una comparación exacta de los títulos de anticuerpos, y sobre todo para comprobar si se han producido cambios significativos (de más de 4 veces) en el título, las muestras deben analizarse de forma paralela en la misma prueba.
- viii) En ocasiones puede ser necesario determinar si el anticuerpo presente en el rebaño está dirigido contra un virus perteneciente a un serogrupo particular de *Pestivirus*. Se puede utilizar una prueba diferencial de NV en la que los sueros se titulan contra virus representativos de cada uno de los grupos de *Pestivirus*, i.e. el VEF, los tipos 1 y 2 del VDVB y el VPPC. El título máximo identificará al serotipo infectante y también se revelará el espectro de reacción cruzada con los restantes serotipos.

## 2.2. Enzimoimmunoanálisis

Se ha descrito un ELISA de captura con MAb para medir los anticuerpos frente al VDV. Dos MAb de pan-pestivirus que detectan epítomos diferentes de la proteína no estructural inmunodominante NS 2/3 se utilizan para capturar el antígeno crecido en cultivo celular y lisado con detergente. Los resultados correlacionan cualitativamente con los de la prueba de NV (Fenton *et al.*, 1991).

### 2.2.1. Preparación del antígeno

El antígeno se prepara como se indica a continuación: Se utilizan ocho frascos de 225 cm<sup>2</sup> de células FLM recientemente confluentes; cuatro frascos servirán como controles y cuatro se infectarán. Los frascos se lavan y se infectan cuatro con 0,01–0.1 m.o.i. (multiplicidad de infección) del VEF citopático Moredun. Se deja que el virus se adsorba durante 2 horas a 37°C. Se añade medio de mantenimiento que contenga FBS al 2% (libre de anticuerpos frente al VEF) y se incuban los cultivos durante 4–5 días hasta que se observa ECP. Se juntan los sobrenadantes de los cuatro frascos que sirven como controles y, por separado, los sobrenadantes de los cuatro frascos infectados. Se centrifugan a 3.000 **g** durante 15 minutos para precipitar las células. Se eliminan los sobrenadantes. Se retienen los precipitados celulares. Se lavan los frascos con 50 ml de PBS y se repite la fase de centrifugación como se ha indicado más arriba. Se juntan todos los precipitados que sirven como controles en 8 ml de PBS que contenga Nonidet P40 al 1% y se devuelven 2 ml a cada frasco control para lisar las células que han permanecido fijadas. Se repite lo mismo para el caso de las células infectadas. Se mantienen los frascos a 4°C durante al menos 2 horas agitando vigorosamente el volumen escaso de líquido en las células durante 30 minutos para asegurar la separación completa de las células. Se



centrifugan el antígeno control y el infectado a 12.000 **g** durante 5 minutos para extraer los residuos celulares. Los antígenos del sobrenadante se conservan a –70°C en alícuotas pequeñas.

### 2.2.2. Procedimiento analítico

- i) Los dos MAb se diluyen a una dilución predeterminada en 0,05 M de tampón bicarbonato, pH 9,6. Todos los pocillos de una placa de microtitulación adecuada para la prueba ELISA (p.ej. Nunc maxisorb, Greiner 129b) se cubren toda la noche con estos anticuerpos a 4°C.
- ii) Después de lavar tres veces con PBST, se añade a todos los pocillos una solución de bloqueo de PBST que contenga suero de caballo al 10% (PBSTH), y se incuban a 37°C durante 1 hora.
- iii) El antígeno se diluye a una dilución predeterminada con PBSTH y se antigenan filas alternas de pocillos con los antígenos víricos y los de controles durante 1 hora a 37°C. Posteriormente, se lavan las placas tres veces con PBST antes de añadirles los sueros problema.
- iv) Los sueros problema se diluyen 1/50 en PBSTH y se añaden a los pocillos con los virus duplicados y los controles duplicados durante 1 hora a 37°C. Posteriormente, se lavan las placas tres veces con PBST.
- v) Se diluye la IgG anti-ovina conjugada a peroxidasa a una dilución predeterminada en PBSTH y se añade a todos los pocillos durante 1 hora a 37°C. Se lavan las placas tres veces con PBST.
- vi) Se añade un sustrato/cromógeno enzimático activado, que sea adecuado, tal como orto-fenilendiamina (OPD) o tetrametil benzidina (TMB). Después del desarrollo de color, la reacción se para con ácido sulfúrico y se lee la absorbancia con un lector de placas ELISA. El valor medio de los dos pocillos controles se sustrae de los valores medios de los dos pocillos víricos para obtener la absorbancia corregida para cada suero. Los resultados se expresan como absorbancia corregida con respecto a la correspondiente absorbancia corregida de los sueros conocidos positivos y negativos. Alternativamente, se pueden extrapolar los títulos del ELISA a partir de una curva estándar de diluciones seriadas de un suero positivo de referencia conocido.

Si se pueden preparar antígenos de suficiente potencia, se puede omitir la etapa de captura con los MAb. En este caso, se cubren filas alternas de los pocillos con el antígeno vírico y control diluidos a una dilución predeterminada en 0,05 M de tampón bicarbonato, pH 9,6, toda la noche a +4°C. Las placas se lavan y bloquean como en la fase (ii) indicada más arriba. Después de lavar, se añaden los sueros problema diluidos y la prueba sigue adelante a partir de la fase (iv), como se indica más arriba.

## C. REQUISITOS PARA LAS VACUNAS

### 1. Antecedentes

Para considerar una vacuna útil contra el VEF, debe ser efectiva al administrarla a las ovejas hembra antes del periodo de cría con el fin de prevenir la infección transplacentaria. En Europa, se han preparado vacunas con el virus VEF entero inactivado con fines experimentales y comerciales (Brun *et al.*, 1993; Vantsis *et al.*, 1980). A diferencia de lo que ocurre con las vacunas contra el VDVB, existe poca demanda de vacunas contra el VEF, y las que se producen son solo productos inactivados. No se ha comercializado ninguna vacuna de subunidades ni atenuada ni recombinante contra el VEF.

Se han encontrado pestivirus contaminantes de vacunas de virus vivos modificados que provocan enfermedades graves después de ser administradas a cerdos, vacas, ovejas y cabras. Entre las vacunas contaminadas, están las utilizadas para el control de la enfermedad de Aujeszky, del VPPC, de rotavirus, de coronavirus, de la peste bovina, de la viruela ovina y de la dermatitis pustular contagiosa. La capacidad insidiosa de los pestivirus para atravesar la placenta y de este modo establecer los animales IP, les proporciona el potencial de contaminar a las vacunas a través de las células, el suero empleado como suplemento en los medios o el virus utilizado como base de inóculo. Como casi todas las cepas de los pestivirus son no citopáticas, permanecerán sin ser detectadas a menos que se lleven a cabo pruebas específicas. Aunque tal contaminación debe ser un problema menos frecuente con una vacuna inactivada, también para su producción deben aplicarse los pasos necesarios para asegurarse de que los materiales que se utilizan no están contaminados.

## 1.1. Características del perfil objetivo del producto

Normalmente, las vacunas contra los pestivirus se clasifican en dos posibles grupos: vacunas vivas modificadas o vacunas inactivadas. El requisito básico para ambos tipos es lograr un nivel alto de infección fetal. Contra el VEF solo se han producido vacunas inactivadas. Las vacunas inactivadas formuladas adecuadamente son muy seguras, pero para que generen niveles satisfactorios de inmunidad normalmente se precisan revacunaciones, lo cual podría ser un inconveniente. Dada la tendencia a la variabilidad antigénica, la vacuna debe contener cepas del VEF estrechamente relacionadas con los virus que se encuentren presentes en la zona en la que se empleen. Esto podría suponer un problema en el caso de las regiones en las que se hallan varios tipos antigénicos del VEF. Debido a la necesidad de adaptar las vacunas a las cepas más frecuentes de cada país o región, no es factible producir un banco de antígenos vacunales que pueda abastecer a todos los países.

En el Capítulo 1.1.8 *Principios de producción de las vacunas veterinarias* se ofrece información sobre la producción de vacunas veterinarias. Las directrices indicadas tanto aquí como en el capítulo 1.1.8 son de carácter general y pueden precisar suplementación según los requisitos nacionales y regionales.

## 2. Descripción de la producción y requisitos mínimos para las vacunas

### 2.1. Características del inóculo

La vacuna ideal debe contener una cepa o cepas del virus que proporcionara protección contra todos los pestivirus ovinos. No obstante, ello podría ser difícil dada la amplia gama de pestivirus que pueden infectar a las ovejas. Existe una considerable variación antigénica entre estos virus – tanto entre los virus que están clasificados en el genogrupo del VEF como entre los virus de los genotipos VDVB1 y VDVB2 (Wensvoort *et al.*, 1989; Becher *et al.*, 2003; Vilcek & Nettleton, 2006). También se han descrito infecciones ovinas por el posible genotipo VDVB-3 (Decaro *et al.*, 2012). Es probable que la composición antigénica de una vacuna varíe entre regiones para lograr una concordancia antigénica suficiente con las cepas víricas dominantes. Es necesario llevar a cabo estudios de neutralización cruzada para establecer combinaciones óptimas. No obstante, parece lógico que cualquier vacuna contra el VEF deba contener al menos un representante de los grupos VEF y VDVB (tipo 1). La caracterización de los virus de las vacunas clonadas biológicamente debe comprender la tipificación con MAB y la genotipificación (Paton *et al.*, 1995).

#### 2.1.2. Criterios de calidad (esterilidad, pureza, ausencia de agentes extraños)

Es fundamental asegurarse de que todos los materiales que se empleen en la preparación de los antígenos a granel se hayan cribado de forma exhaustiva para garantizar la ausencia de agentes extraños. Ello debe incluir los inóculos primario y de trabajo, los cultivos celulares y todos los suplementos de los medios, como el suero bovino. Ciertos virus bovinos, y sobre todo el VDVB, pueden infectar fácilmente a los pequeños rumiantes, como las ovejas. Por lo tanto, es especialmente importante asegurarse de que todos los sueros utilizados que sean de origen bovino estén libres tanto de VDVB accidentales como de anticuerpos contra las cepas del VDVB, porque apenas una pequeña cantidad tanto de virus como de anticuerpos puede enmascarar la presencia de otros. Asimismo, debe comprobarse la esterilidad y ausencia de contaminación por otros agentes en los materiales e inóculos vacunales, sobre todo en cuanto a virus, como se describe en los capítulos 1.1.8 y capítulo 1.1.9 *Pruebas de esterilidad y ausencia de contaminación en los materiales biológicos de uso veterinario*.

Si una vacuna supera las pruebas básicas, debe comprobarse la eficacia de la vacunación en función de la capacidad de prevenir una transmisión transplacentaria. Se ha logrado un desafío efectivo de ovejas gestantes que se hallaban en los días 50-60 de gestación y estaban vacunadas, mediante la instilación intranasal de virus o bien mezclándolas con ovejas con IP (Brun *et al.*, 1993). Normalmente, esta práctica da lugar de forma fiable a una descendencia con viremia persistente en ovejas no inmunes. En las zonas en las que es habitual hallar múltiples genotipos de los virus de la VEF, debe comprobarse la eficacia de la protección frente a múltiples cepas.

### 2.2. Método de fabricación

#### 2.2.1. Procedimiento

Se han preparado vacunas inactivadas empleando técnicas de laboratorio convencionales con cultivos celulares estáticos o rotatorios. Como inactivantes se ha utilizado formalina y beta-

propiolactona, y como adyuvantes, hidróxido de aluminio y aceite (Brun *et al.*, 1993; Vantsis *et al.*, 1980). Los rendimientos óptimos dependen del tipo celular y de las cepas empleadas. Se ha preparado una vacuna comercial contra el VEF que contiene dos cepas del virus y que se prepara en líneas celulares ovinas (Brun *et al.*, 1993). Las células se deben preparar de acuerdo con el sistema de lotes del inóculo procedente de un virus del inóculo original (MCS) que se haya demostrado que está libre de microorganismos contaminantes. Solo se debe preparar la vacuna en células con menos de 20 pases a partir del MCS. Se debe comprobar que no existe contaminación debida a pestivirus en células control procedentes de cada pase.

Pueden aplicarse procedimientos estándar con el fin de recoger virus no citopático los días 4-7 tras la inoculación de los cultivos. El rendimiento óptimo del virus infeccioso dependerá de varios factores, como el cultivo celular, la cepa utilizada y la tasa inicial de siembra del virus. Para establecer las condiciones óptimas para la producción de virus a gran escala, deben tenerse en cuenta estos factores y debe investigarse la cinética de replicación del virus. Tanto si se produce una vacuna viva como una vacuna inactivada, el objetivo básico será producir una reserva de virus de título alto. Esta preparación de antígeno a granel puede adaptarse posteriormente al tipo de vacuna que se pretenda fabricar.

### 2.2.2. Requisitos para los ingredientes

Las vacunas contra el VEF se suelen producir en cultivos celulares de origen ovino, que a menudo se suplementan con componentes del medio de origen animal. El material más preocupante es el suero bovino, debido a la posible contaminación por VEF y por anticuerpos contra estos virus. Estos posibles contaminantes no solo afectan a la eficiencia de la producción sino que también podrían enmascarar la presencia de niveles bajos de algún VDVB infeccioso que podría tener características indeseables. La esterilidad y la ausencia de contaminación por otros agentes, sobre todo virus, no solo debe comprobarse en los inóculos víricos sino también en todos los demás materiales, como se describe en los capítulos 1.1.8 y 1.1.9. Asimismo, todos los materiales de origen bovino u ovino deben proceder de un país con un riesgo insignificante de encefalopatías espongiiformes transmisibles (véase el capítulo 1.1.9).

### 2.2.3. Controles durante el proceso

Los controles que se llevan a cabo durante el proceso forman parte del proceso de fabricación. Los cultivos deben inspeccionarse regularmente para comprobar que permanecen libres de contaminación bacteriana macroscópica y para poder realizar un seguimiento de la salud de las células y de la presencia o ausencia de ECP, según corresponda. Aunque el requisito básico para la eficacia es la capacidad de inducir una respuesta de anticuerpos neutralizantes aceptable, durante la producción, pueden controlarse las concentraciones objetivo de antígeno necesarias para lograr una respuesta aceptable de forma indirecta con una evaluación de la cantidad de virus infeccioso o masa antigénica que se está produciendo. Las pruebas de diagnóstico rápidas, como el ELISA, resultan útiles para controlar la producción de antígeno de VDVB. Como alternativa, puede determinarse la calidad de un lote de antígeno mediante una titulación de la cantidad de virus infeccioso que se halla presente, aunque este método podría subestimar la cantidad de antígeno. En el caso de las vacunas inactivadas, la infectividad se evalúa antes de la inactivación. En las vacunas inactivadas, debe determinarse la cinética de inactivación para poder calcular un margen de seguridad adecuado e incluirlo en los procesos de producción de rutina. Al final de la producción, deben llevarse a cabo pruebas de cultivo celular *in-vitro* para confirmar que ha terminado la inactivación. Estas pruebas de inocuidad deben incluir suficientes pases y volumen de inóculo como para garantizar la detección incluso de niveles muy bajos de virus infeccioso.

### 2.2.4. Pruebas en lotes de producto final

#### i) Esterilidad

Las pruebas de esterilidad y ausencia de contaminación en los materiales biológicos de uso veterinario se explican en el Capítulo 1.1.9.

#### ii) Identidad

Las pruebas de identidad deben permitir demostrar que no hay ninguna otra cepa del VEF al propagar varias cepas en una instalación en la que se produzcan vacunas multivalentes.

iii) Inocuidad

Se debe comprobar rigurosamente que las muestras procedentes de las vacunas inactivadas carecen de virus viables. Se deben realizar como mínimo tres pases con muestras del producto empleando cultivos celulares susceptibles para asegurar la ausencia del VEF vivo. Este control *in vitro* se puede mejorar inyectando dos ovejas seronegativas para el VEF con 20 dosis de antígeno sin valorar como parte de una prueba de inocuidad estándar. La presencia del virus vivo tendrá como resultado el desarrollo de una respuesta serológica más convincente que la que se observaría utilizando el virus inactivado solo. También se pueden examinar los sueros de ovejas inoculadas para detectar anticuerpos dirigidos contra otros posibles microorganismos contaminantes.

Las pruebas de inocuidad también deben consistir en detectar posibles reacciones adversas a la vacuna, ya sean locales o sistémicas, por todas las vías de administración. Se precisarán pruebas de inocuidad lote a lote a no ser que se demuestre la inocuidad del producto, que esta esté aprobada en el expediente de registro, y que la producción se lleve a cabo de acuerdo con lo establecido en el Capítulo 1.1.8. Debe demostrarse que las vacunas son inocuas en ovejas gestantes (es decir, que no se produce transmisión al feto), o bien deben autorizarse solo si incluyen una advertencia de que no utilización en animales gestantes.

iv) Potencia del lote

Asimismo, es mejor comprobar la potencia de la vacuna con ovejas seronegativas en las que se mida el desarrollo y nivel de anticuerpos. En las vacunas contra el VEF se debe comprobar que producen respuestas inmunitarias suficientes cuando se utiliza su formulación final según las instrucciones publicadas por el fabricante. Una medida indirecta de la potencia la proporciona el nivel de la infección vírica previa a la inactivación. Deben emplearse pruebas *in-vitro* para realizar un seguimiento de cada uno de los lotes durante la producción. El contenido antigénico después de la inactivación se puede valorar mediante un ELISA de captura con MAb y relacionar con los resultados de potencia establecidos *in vivo*. Se aconseja demostrar que la dosis más baja recomendada de la vacuna puede prevenir la transmisión transplacentaria del VEF en ovejas gestantes.

## 2.3. Requisitos para la autorización/registro/licencia

### 2.3.1. Proceso de fabricación

Para el registro de una vacuna, deben enviarse a las autoridades correspondientes todos los datos relativos a la fabricación de la vacuna y a las pruebas de control de calidad. A no ser que las autoridades especifiquen lo contrario, debe proporcionarse información de tres lotes consecutivos de la vacuna con un volumen no inferior a 1/3 del volumen habitual de un lote industrial.

No existe un método estándar de fabricación de una vacuna contra el VEF, pero pueden aplicarse técnicas de laboratorio convencionales con cultivos celulares estáticos, rotatorios o en suspensión (micro-portadores). Pueden prepararse vacunas inactivadas mediante métodos convencionales, como la inactivación con etilénimina binaria, formalina o beta-propiolactona (Park & Bolin, 1987). Existen varios adyuvantes que pueden utilizarse.

### 2.3.2. Requisitos de inocuidad

Deben llevarse a cabo pruebas *in-vivo* empleando dosis repetidas (teniendo en cuenta el número máximo de dosis de vacunación primaria y, si corresponde, de la primera revacunación/vacuna de refuerzo) y empleando la carga de antígeno máxima permitida y, dependiendo de la formulación de la vacuna, el número máximo de cepas vacunales.

i) Inocuidad en especies de destino y no de destino

La inocuidad de la formulación del producto final de las vacunas inactivadas debe comprobarse en ovejas jóvenes susceptibles que no tengan anticuerpos de origen materno y en ovejas gestantes. En estos animales debe comprobarse si presentan reacciones locales tras la administración y, en el caso de las ovejas gestantes, si el cordero no nacido sufre algún efecto.

ii) Reversión a la virulencia en vacunas atenuadas/vivas y consideraciones medioambientales

En el caso de que se haya desarrollado una vacuna de virus vivo contra el VEF, deben inocularse inóculos víricos que se hayan pasado al menos hasta el límite de pases especificado para el inóculo, y preferiblemente hasta más allá de tal límite, a corderos de corta edad para confirmar que no causan signos de enfermedad. Si una vacuna viva atenuada se ha registrado para su uso en animales gestantes, las pruebas de reversión a la virulencia también deben incluir animales gestantes. Las vacunas vivas atenuadas no pueden ser transmisibles a animales no vacunados que hayan “contactado” con los vacunados.

iii) Precauciones (peligros)

El VEF no se considera un peligro para la salud humana. La aplicación de unas buenas prácticas de microbiología estándar debe ser suficiente para manipular el virus en el laboratorio. Aunque la presencia del virus inactivado en una vacuna debe considerarse inocua para las personas que administran el producto, los adyuvantes de la vacuna sí pueden causar lesiones en el ser humano. Los fabricantes deben advertir claramente de que debe buscarse asistencia médica en caso de auto-inyección (incluidos adyuvantes, vacuna en emulsión oleosa, conservantes, etc.), y tales advertencias deben figurar tanto en la ficha técnica como en el prospecto del producto para que la persona que lo administre sea consciente de tal peligro.

### 2.3.3. Requisitos de eficacia

La potencia de la vacuna debe determinarse mediante la inoculación a corderos seronegativos y negativos para el virus, seguida de una comprobación de la respuesta de anticuerpos. El contenido antigénico puede determinarse mediante una titulación de la infectividad previa a la inactivación y, posteriormente, con un ELISA que se ajustará, según sea necesario, a un nivel estándar para la vacuna en cuestión. No existen protocolos analíticos estandarizados que sean aplicables a todas las vacunas. Los lotes de vacuna viva pueden analizarse mediante una titulación de la infectividad. Cada lote de producción de vacuna debe someterse a pruebas de potencia y de inocuidad, cuyos resultados se valorarán en función de los criterios de liberación. Se debe demostrar que las vacunas contra el VEF producen respuestas inmunitarias suficientes, como se ha descrito anteriormente, al utilizar su formulación final de acuerdo con las instrucciones publicadas por el fabricante.

### 2.3.4. Vacunas que permiten una estrategia DIVA (detección de infección en animales vacunados)

Hasta la fecha, no existen vacunas comerciales contra el VEF que permitan aplicar una verdadera estrategia DIVA.

### 2.3.5. Duración de la inmunidad

Es improbable que las vacunas inactivadas proporcionen niveles sostenidos de inmunidad y es probable que después de un tratamiento inicial de 2 o 3 inyecciones sean necesarias dosis anuales de refuerzo. No se dispone de información suficiente para determinar si existe una correlación entre los títulos de anticuerpos vacunales en la hembra progenitora y la protección fetal. Dado que es probable que existan distintas formulaciones comerciales y que cada cual contendrá un tipo distinto de adyuvantes, probablemente habrá también distintos periodos de eficacia. En consecuencia, los datos sobre la duración de la inmunidad deben calcularse de forma independiente para cada producto comercial llevando a cabo pruebas de desafío al final del periodo de inmunidad indicado.

### 2.3.6. Estabilidad

No existen normas consensuadas relativas a la estabilidad de las vacunas contra el VEF, pero se puede considerar que una vacuna con virus inactivado debe mantener su potencia durante al menos 1 año si se conserva a 4 °C, y probablemente durante más tiempo. Unas temperaturas inferiores podrían prolongar el periodo de validez, pero los adyuvantes de una vacuna muerta podrían impedir tal prolongación. Los antígenos a granel que no se hayan formulado para una vacuna terminada pueden conservarse congelados a bajas temperaturas de manera fiable, pero antes de incorporarlos a un lote de vacuna deberá comprobarse la calidad del antígeno con pruebas *in-vitro*.

## BIBLIOGRAFÍA

BARLOW R.M. & PATTERSON D.S.P. (1982). Border disease of sheep: a virus-induced teratogenic disorder. *Adv. Vet. Med. (Suppl. J. Vet. Med.)*, **36**, 1–87.

- BECHER P., AVALOS-RAMIREZ R., ORLICH M., CEDILLO ROSALES S., KONIG, M., SCHWEIZER M., STALDER H., SCHIRRMER H & THIEL H.-J. (2003). Genetic and antigenic characterisation of novel pestivirus genotypes; Implications for classification. *Virology*, **311**, 96–104.
- BECHER P., ORLICH M. & THIEL H.-J. (1998). Complete genomic sequence of border disease virus a pestivirus from sheep. *J. Virol.*, **72**, 5165–5173.
- BRAUN U., HILBE M., EHRENSPERGER F., SALIS F., ALTHER P., STRASSER M., STALDER H.P. & PETERHANS E. (2002). Border Disease in einem Schafbetrieb. *Schweiz. Arch. Tierheilk.*, **144**, 419–426.
- BRUN A., LACOSTE F., REYNAUD G., KATO F. & SAINT-MARC B. (1993). Evaluation of the potency of an inactivated vaccine against border disease pestivirus infection in sheep. *In: Proceedings of the Second Symposium on Pestiviruses*, Edwards S., ed. Fondation Marcel Merieux, Annecy, France, 1–3 October 1992, 257–259
- CARLSSON U. (1991). Border disease in sheep caused by transmission of virus from cattle persistently infected with bovine virus diarrhoea virus. *Vet. Rec.*, **128**, 145–147.
- CHAPPUIS G., BRUN A., KATO F., DAUVERGNE M., REYNAUD G. & DURET C. (1986). Etudes serologiques et immunologiques realisees a la suite de l'isolement d'un pestivirus dans un foyer ovina chez des moutons de L'Aveyron. *In: Pestiviroses des Ovins et des Bovins*, Espinasse J. & Savey M. eds. Ste Françoise de Buiatrie, Paris, France, **55**, 66.
- DECARO N., MARI V., LUCENTE M., SCIARRETTA R., MORENO A., ARMENISE C., LOSURDO M., CAMERO M., LORUSSO E., CORDIOLI P., & BUONAVOGLIA C. (2012). Experimental infection of cattle, sheep and pigs with 'Hobi'-like pestivirus. *Vet. Microbiol.*, **155**, 165–171.
- DEKKER A., WENSVOORT G. & TERPSTRA C. (1995). Six antigenic groups within the genus pestivirus as identified by cross-neutralisation assays. *Vet. Microbiol.*, **47**, 317–329.
- ENTRICAN G., DAND A. & NETTLETON P.F. (1994). A double monoclonal-antibody ELISA for detecting pestivirus antigen in the blood of viraemic cattle and sheep. *Vet. Microbiol.*, **43**, 65–74.
- FENTON A., SINCLAIR J.A., ENTRICAN G., HERRING J.A. & NETTLETON P.F. (1991). A monoclonal antibody capture ELISA to detect antibody to border disease virus in sheep sera. *Vet. Microbiol.*, **28**, 327–333.
- INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES (2016). Virus Taxonomy 2015 release. <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>
- NETTLETON P.F., GILMOUR J.S., HERRING J.A. & SINCLAIR J.A. (1992). The production and survival of lambs persistently infected with border disease virus. *Comp. Immunol. Microbiol. infect. Dis.*, **15**, 179–188.
- NETTLETON P.F., GILRAY J.A., RUSSO P. & DLISSI E. (1998). Border disease of sheep and goats *Vet. Res.*, **29**, 327–340.
- OGUZOGLU T.C., FLOEGEL-NIESMANN G., FREY H.R. & MOENNIG V. (2001). Differential diagnosis of classical swine fever and border disease: seroepidemiological investigation of a pestivirus infection on a mixed sheep and swine farm. *Dtsch Tierarztl. Wochenschr.*, **108**, 210–213.
- PARK B.K. & BOLIN S.R. (1987). Molecular changes of bovine viral diarrhoea virus polypeptides treated with binary ethylenimine, beta-propiolactone and formalin. *Res. Rep. Rural Dev. Admin. (L&V) Korea*, **29**, 99–103.
- PATON D.J., SANDS J.J., LOWINGS J.P., SMITH J.E., IBATA G. & EDWARDS S. (1995). A proposed division of the pestivirus genus into subgroups using monoclonal antibodies, supported by cross-neutralization assays and genetic sequencing. *Vet. Res.*, **26**, 92–109.
- RIDPATH J.F. & BOLIN S.R. (1997). Comparison of the complete genomic sequence of the border disease virus, BD31, to other pestiviruses. *Virus Res.*, **50**, 237–243.
- THABTI F., FRONZAROLI L., DLISSI E., GUIBERT J.M., HAMMAMI S., PEPIN M. & RUSSO P. (2002). Experimental model of border disease virus infection in lambs: comparative pathogenicity of pestiviruses isolated in France and Tunisia. *Vet. Res.*, **33**, 35–45.
- THUR B., HILBE M., STRASSER M. & EHRENSPERGER F. (1997). Immunohistochemical diagnosis of pestivirus infection associated with bovine and ovine abortion and perinatal death. *Am. J. Vet. Res.*, **58**, 1371–1375.

VALDAZO-GONZALEZ B., ALVAREZ-MARTINEZ M. & SANDVIK T. (2007). Genetic and antigenic typing of border Disease virus isolates in sheep from the Iberian peninsula. *Vet. J.*, **174**, 316–324.

VAN RIJN P.A., VAN GENNIP H.G.P., LEENCLERSE C.H., BRUSCHKE C.J.M., PATON D.J., MOORMANN R.J.M. & VAN OIRSCHOT J.T. (1997). Subdivision of the pestivirus genus based on envelope glycoprotein E2 *Virology*, **237**, 337–348.

VANTSIS J.T., BARLOW R.M., FRASER J. & MOULD D.L. (1976). Experiments in border disease VIII. Propagation and properties of a cytopathic virus. *J. Comp. Pathol.*, **86**, 111–120.

VANTSIS J.T., RENNIE J.C., GARDINER A.C., WELLS P.W., BARLOW R.M. & MARTIN W.B. (1980). Immunisation against Border disease. *J. Comp. Path.*, **90**, 349–354.

VILCEK S. & NETTLETON P.F. (2006). Pestiviruses in wild animals *Vet. Microbiol.*, **116**, 1–12.

VILCEK S., NETTLETON P.F., PATON D.J. & BELAK S. (1997). Molecular characterization of ovine pestiviruses. *J. Gen. Virol.*, **78**, 725–735.

WENSVOORT G. & TERPSTRA C. (1988). Bovine viral diarrhoea virus infection in piglets born to sows vaccinated against swine fever with contaminated virus. *Res. Vet. Sci.*, **45**, 143–148.

WENSVOORT G., TERPSTRA C. & DE KLUYVER E.P. (1989). Characterisation of porcine and some ruminant pestiviruses by cross-neutralisation. *Vet. Microbiol.*, **20**, 291–306.

WILLOUGHBY K., VALDAZO-GONZALEZ, B., MALEY M., GILRAY J. & NETTLETON P.F. (2006). Development of a real time RT-PCR to detect and type ovine pestiviruses. *J. Virol. Methods*, **132**, 187–194.

\*  
\* \*

**NB:** En el momento de la publicación (2021) no existían Laboratorios de Referencia de la OIE para la enfermedad de la frontera (puede consultarse la página web de la OIE: <https://www.oie.int/es/que-ofrecemos/red-de-expertos/laboratorios-de-referencia/#ui-id-3>)

**NB:** ADOPTADO POR PRIMERA VEZ EN 1996. ÚLTIMAS ACTUALIZACIONES ADOPTADAS EN 2017.